

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Fyziologie zvířat



**Význam adrenergního systému v procesu chladové adaptace**

*The role of the adrenergic system in the process of cold acclimation*

**Anna Dynybylová**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Praha 2015

# ABSTRAKT

Schopnost udržet stálou hladinu tepla je pro přežití savců nezbytná. V průběhu evoluce se u savců vyvinuly účinné strategie v podobě třesové a netřesové termogeneze, které se rozvíjejí během expozice chladu. Tato práce se zaměřuje na netřesovou termogenezi, která se rozvíjí, pokud chladový stres trvá delší dobu, probíhá v hnědé tukové tkáni a je stimulována především noradrenalinem vylévaným ze sympatického nervového systému. Princip generování tepla spočívá v narušení protonového gradientu v mitochondriích rozpřahovacím proteinem (UCP1), přičemž teplo vzniká jako vedlejší produkt. Mechanismus disipace energie organismus využívá během chladové expozice, ale také po trávení především vysokotučných pokrmů, a může tedy být inspirací pro možné terapeutické léčení obezity a s ní spojených nemocí. Tato práce shrnuje současné poznatky o roli adrenergní signalizace v procesu chladové adaptace.

Klíčová slova: chladová adaptace, netřesová termogeneze, hnědá tuková tkáň, sympatický nervový systém, uncoupling protein 1 (UCP1), obezita

# ABSTRACT

The ability to keep constant body temperature is necessary for mammals. There are effective strategies developed during the evolution – shivering and nonshivering thermogenesis, which start during cold exposure. This thesis is focused on the nonshivering thermogenesis which occurs in brown adipose tissue and is controlled by norepinephrine released from the sympathetic nerves if the cold stress persists for a long time. The principle of the heat production is based on function of the uncoupling protein 1 which disrupts the proton gradient in mitochondria thereby releasing heat the waste product. Similar mechanism of energy dissipation is used not only during cold exposure but also after digestion of high fat diet, which may provide clues for potential therapeutic treatment of obesity and associated metabolic diseases. This study summarizes current knowledge about the role of adrenergic signalling in the process of cold acclimation.

Key words: cold acclimation, nonshivering thermogenesis, brown adipose tissue, sympathetic nerve system, uncoupling protein 1 (UCP1), obesity

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 11. 5. 2015

Anna Dynybylová

### **Poděkování**

Velmi děkuji Doc. RNDr. Jiří Novotnému, DSc. za trpělivost a čas, které mi věnoval.

# Obsah

Seznam zkratk .....	5
Úvod .....	7
Termogeneze .....	8
Expozice chladu .....	9
Akutní chladový stres .....	9
Chronický chladový stres .....	10
Hnědá tuková tkáň .....	11
Typy tukové tkáně .....	12
Umístění hnědé tukové tkáně v těle .....	12
Diferenciace hnědých adipocytů .....	13
Netřesová termogeneze .....	15
Regulace hnědé tukové tkáně .....	16
Regulace na úrovni organismu: .....	16
Regulace na buněčné úrovni: .....	16
Adrenergní receptory v hnědých tukových buňkách .....	19
$\beta$ -Adrenergní receptory .....	19
Přenos signálu v buňce via $\beta_3$ receptory .....	20
$\alpha_1$ -Adrenergní receptory .....	21
$\alpha_2$ -Adrenergní receptory .....	22
Uncoupling protein 1 .....	22
Substráty pro netřesovou termogenezi .....	25
Závěr .....	28
Seznam literatury .....	30

# Seznam zkratek

<b>AC</b>	adenylát cyklasa	
<b>AR</b>	adrenergní receptor	
<b>ATCL</b>	tuková triglyceridová lipasa	<i>adipose triglycerid lipase</i>
<b>ATP</b>	adenosintrifosfát	
<b>BAT</b>	hnědá tuková tkáň	<i>brown adipose tissue</i>
<b>bFGF</b>	bazický fibroblastový růstový faktor	<i>basic fibroblast growth factor</i>
<b>BMP7</b>	kostní morfogenetický faktor 7	<i>bone morfogenic protein 7</i>
<b>(c)AMP</b>	(cyklický) adenosinmonofosfát	
<b>C/EBPs</b>	regulační proteiny vázající se do aktivační sekvence CCAAT v promotoru více genů	<i>CCAAT-enhancer-binding proteins</i>
<b>CRE</b>	cAMP responzivní element	
<b>CREB</b>	protein vázající cAMP responzivní element	<i>cAMP-response element - binding protein</i>
<b>DAG</b>	diacylglycerol	
<b>DARPP</b>	fosfoprotein regulovaný dopaminem a cAMP	<i>dopamine- and cyclic AMP- regulated phosphoprotein</i>
<b>ELOVL</b>	enzym prodlužující mastné kyseliny	
<b>ERK</b>	kinasa regulovaná extracelulární signalizací	<i>extracellular signaling regulated kinase</i>
<b>FABP</b>	protein vázající mastné kyseliny	<i>fatty acid binding protein</i>
<b>FADH<sub>2</sub></b>	flavinadeninukleotid (redukováná forma)	
<b>FATC</b>	transportér mastných kyselin	<i>fatty acid transport protein</i>
<b>GDP</b>	guanosindifosfát	
<b>GLUT4</b>	glukózový transportér 4	
<b>G<sub>i</sub></b>	inhibiční G protein	
<b>G<sub>s</sub></b>	stimulační G protein	
<b>hMADS</b>	lidské multipotentní tukové kmenové buňky	<i>human multipotent adipose- derived stem</i>
<b>HSL</b>	hormon senzitivní lipasa	

<b>HSP</b>	protein tepelního šoku	<i>heat shock protein</i>
<b>ICER</b>	cAMP indukovaný časný represor	<i>inducible cAMP early repressor</i>
<b>IP<sub>3</sub></b>	inositol - 1,4,5 - trifosfát	
<b>LCFA</b>	mastné kyseliny s dlouhým řetězcem	<i>long chain fatty acid</i>
<b>LPL</b>	lipoproteinlipasa	
<b>MAPK</b>	mitogeny aktivovaná proteinkinasa	
<b>MEK</b>	kinasa regulovaná extracelulární signalizací	<i>extracellular signaling - regulated kinase</i>
<b>MGL</b>	monoglyceridová lipasa	
<b>MK</b>	mastné kyseliny	
<b>Myf5</b>	myogenní faktor 5	
<b>NADH + H<sup>+</sup></b>	nikotinamidadenin dinukleotid fosfát (redukována forma)	
<b>NE</b>	noradrenalin (norepinefrin)	
<b>PGC-1</b>	koaktivátor receptoru aktivovaného proliferátorem peroxisomů γ 1	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1</i>
<b>PIP2</b>	fosfatidylinositol - 4,5 - bisfosfát	
<b>PKA</b>	proteinkinasa A	
<b>PKC</b>	proteinkinasa C	
<b>PLC</b>	fosfolipasa C	
<b>PPAR γ (α)</b>	receptor aktivovaný proliferátorem peroxisomů γ (α)	<i>peroxisome proliferator-activated receptor γ (α)</i>
<b>PRDM16</b>	PR doména obsahující 16	<i>PR domain containing 16</i>
<b>SNS</b>	sympatický nervový systém	
<b>TG</b>	triacylglyceridy	
<b>TGF</b>	transformační růstový faktor	<i>transforming growth factor</i>
<b>TNF</b>	tumor nekrotický faktor	
<b>UCP1</b>	rozpřahující protein	<i>uncoupling protein 1</i>
<b>WAT</b>	bílá tuková tkáň	<i>white adipose tissue</i>

Poznámka: Anglický překlad je uveden pouze v případě, že se běžně používá zkratka, která z tohoto anglického názvu vychází a českému výrazu neodpovídá.

# Úvod

Expozice chladu je stres se zásadním vlivem na život organismu. Pokud teplota klesá pod termoneutrální zónu, je organismus vystaven chladovému stresu a musí se s ním vyrovnat, pokud má přežít. Savci dokázali v průběhu evoluce na chlad efektivně reagovat. Dlouhodobý chladový stres totiž aktivuje v organismu adaptivní změny, které ovlivní reakce organismu na chlad v budoucnosti, a umožní mu tak lépe přežít další chladná období.

Již více než čtyřicet let je spojován chladový stres (především dlouhodobý) s termogenní odpovědí hnědé tukové tkáně, která má schopnost přeměnit energii z jídla na teplo. Tuto schopnost využívá organismus nejen během expozice chladu, kdy je teplo generováno pro udržení stálé tělesné teploty, ale také při přejídání pro disipaci energie z potravy [2]. Hnědá tuková tkáň je tedy významným termogenním orgánem především malých savců, který hraje zásadní roli v udržování energetické homeostázy. Jelikož se výskyt hnědé tukové tkáně potvrdil i u dospělého člověka [13], není divu, že stále roste zájem o případné klinické využití této tkáně v boji proti obezitě. Další výzkumy se pokoušejí hledat mechanismy hnědé tukové tkáně v jiných lidských orgánech a zdá se, že jsou úspěšné. I bílá tuková tkáň přeměněná za určitých okolností na tzv. běžové tukové buňky [11] je schopna disipace energie. V regulaci hnědé tukové tkáně, ale snad i během přeměny bílých adipocytů na adipocyty běžové a v samotné regulaci termogeneze v běžových tukových buňkách hraje kritickou roli noradrenalin uvolňovaný ze sympatického nervového systému.

Chladová adaptace je přesněji řečeno proces, při kterém se živočich vystavený chronickému chladu tomuto stresu začíná přizpůsobovat, v jeho těle probíhají změny na mnoha úrovních. Takto adaptovaný jedinec vykazuje vyšší termogenezi a především větší množství metabolicky aktivní hnědé tukové tkáně, která negativně koreluje s množstvím bílého tuku a BMI (index tělesné hmotnosti) [9], a tudíž na chlad adaptovaný jedinec má predispozici být odolnější vůči obezitě než jedinec na chlad neadaptovaný. Mechanismy chladové adaptace celkem dobře odpovídají termogenezi indukované stravou, má proto smysl se jimi zabývat. Další výzkum mechanismů chladové adaptace může také přispět k lepšímu poznání benefitů spojených s otužováním.

Cílem této práce je shrnout vliv působení chladu především na úrovni hnědé tukové tkáně, neboť přitom dochází k proliferaci a diferenciaci hnědých tukových buněk potenciálně schopných zvýšeného spalování tuků. Mimo další aktivátory hnědé tukové tkáně je v této práci

zdůrazněn vliv noradrenalinu, který je pro stimulaci chladem a stravou indukovaných změn nejdůležitější.

## Termogeneze

Termogeneze je děj v organismu, při kterém se na úkor přijaté energie (např. získávané z potravy) vyrábí teplo.

Typ termogeneze, kterým se tato práce zabývá (netřesová termogeneze, viz podkapitola netřesová termogeneze), se vyskytuje u savců, kteří za normálních okolností udržují tělesnou teplotu vyšší, než je teplota okolí a hodnota jejich teploty je udržována v úzkém rozmezí (živočichové tímto způsobem zacházející s teplem se nazývají homotermní endotermové – vedle savců také ptáci).

Termogenezi můžeme rozdělit na dvě základní složky [2, 63]:

- 1) Obligatorní termogeneze (zajišťující stálou vnitřní teplotu pro bazální tělesné děje - vyskytuje se i u poikilotermních živočichů)
- 2) Fakultativní termogeneze (generování tepla reaguje na aktuální podmínky a potřeby hospodaření se získávanou energií):
  - svalová termogeneze
  - netřesová termogeneze

Termogeneze většiny homeotermních živočichů má za účel zefektivnění a zrychlení chemických reakcí. Zrychlení chemických reakcí (způsobené také zvýšením tepla) umožňuje zvýšení celkového obrátu energie v buňce [2]. Netřesová termogeneze, kterou se tato práce blíže zabývá, poskytuje organismu teplo hlavně během chladného období, a tak je organismus schopný doplňovat tepelné ztráty a udržet se na teplotě potřebné pro život. Termogeneze je pravděpodobně spoluzodpovědná za úspěch savců v evoluci (přežití během dob ledových; savčí mláďata vybavena dostatkem hnědé tukové tkáně jsou po narození schopná se sama zahřívat) [3]. Netřesová termogeneze probíhá především v hnědé tukové tkáni, která je zejména u chladově adaptovaných živočichů bohatě prokrvena a inervovaná sympatickým nervovým systémem.

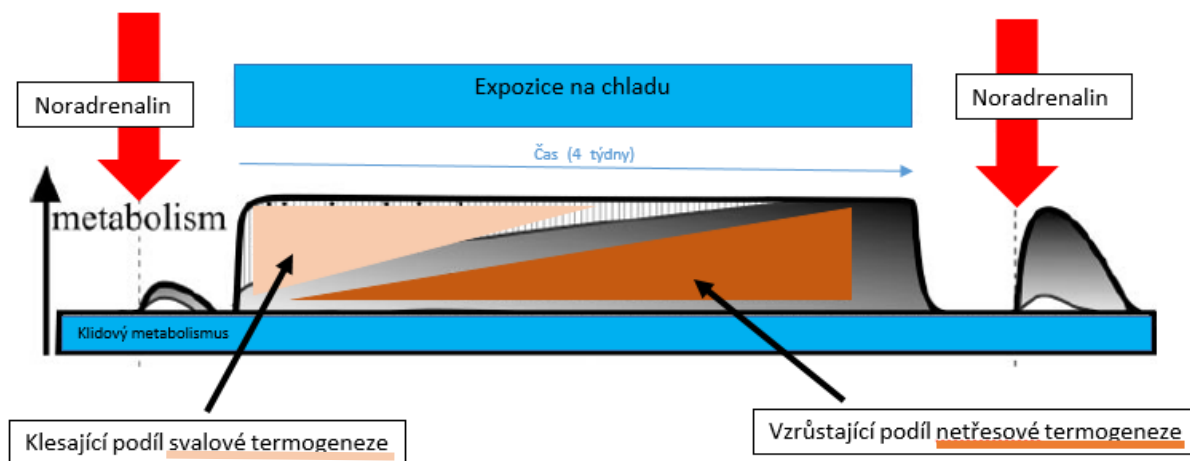
Aktivitu hnědé tukové tkáně můžeme měřit přímo (měřením zvýšení teploty hnědé tukové tkáně oproti tělesné teploty) nebo nepřímou. Nepřímá metoda vyplývá ze základního poznatku, že netřesová termogeneze je založená na oxidaci substrátů a následné přeměně energie takto



získané na teplo. Nepřímé měření netřesové termogeneze je tedy zjednodušeně řečeno prováděno měřením spotřeby kyslíku, která je míře netřesové termogeneze přímo úměrná. Přímá metoda měření teploty hnědé tukové tkáně není kvantifikovatelná a proto, i přes svoji těžkopádnost a také ne úplnou kvantifikovatelnost, se používá metoda založená na měření spotřeby kyslíku [2, 3].

## Expozice chladu

Organismus vystavený chladu je potenciálně ohrožen rizikem smrti, a proto se během evoluce vyvinuly mechanismy, které prochlazení organismu mají zabránit. U savců se vyvinuly svalová a netřesová termogeneze. Oba mechanismy přeměňují energii na teplo, každá ale jiným způsobem. Procesy, které se dějí v těle organismu vystaveném chladu, se významně liší podle doby chladové expozice. Zatímco při akutním chladu se organismus především začne třást a využívat tak svalů pro generování tepla, během chronického vystavení chladu se už začnou zapojovat mechanismy netřesové termogeneze v hnědé tukové tkáni. Samozřejmě změna těchto dvou typů termogenezí není okamžitá (viz názorný obrázek 1 shrnující poznatky mnoha studií o průběhu tohoto přechodu).



Obrázek 1: Podíl svalové a netřesové termogeneze na zvýšení metabolismu během chladové expozice. Červené šipky značí injekci noradrenalinu, který účinkuje na generování tepla (zvýšení metabolismu) po 4 týdenní chladové adaptaci efektivněji než při podání neadaptovanému jedinci (vysvětleno v kapitole o regulaci hnědé tukové tkáně) – upraveno podle [3].

### Akutní chladový stres

Akutním chladovým stresem se rozumí vystavení živočicha (jinak přivyklého teplotě vyšší než 20 °C) do podmínek nižší teploty, standardně okolo 5 °C pro experimentální účely, v normálním

životě je chladový stres jakékoliv snížení teploty z oblasti termoneutrální zóny na teplotu nižší. Živočich musí tedy svůj bazální metabolismus zvýšit tak, aby doplnil ztráty tepla – tepelná ztráta závisí na snížené teplotě a dalších okolnostech (velikost živočicha, připravenost na chlad, aj). Menší živočichové potřebují více tepla, protože jejich relativní povrch, plocha kontaktu (ku celému objemu těla) s okolím je větší. Živočich začne využívat všechny své aktuální možnosti v netřesové i třesové termogenezi. Při vystavení chladu organismus sníží svou metabolickou rychlost, snaží se kontrolovat své tepelné zásoby. V akutní fázi (trvající i několik týdnů) se ke zvýšení tepla využívá třes svalů – tzv. třesová termogeneze (svaly svou nekoordinovanou činností nezpůsobují stah, ale produkují teplo). K tomu je potřeba dodávat dostatek kyslíku do svalů. Míra zvýšení jejich aktivity je závislá na stupni chladu - při nižší teplotě potřebuje organismus větší příjem kyslíku [3].

Obecně reakce na vystavení akutním chladovým podmínkám vychází ze zkušenosti se setkáním s chladem v minulosti. Organismus může reagovat na chlad i bez předchozí zkušenosti, ale pro vytrvání je výhodné mít celou řadu „natrénovaných“ (přizpůsobených) vlastností – větší kapacita srdce, plic, hustší prokrvení svalové tkáně, dobře vyvinuté svalstvo. K účinné reakci na akutní chlad přispívá i hnědá tuková tkáň, která pomáhá svalům svou netřesovou výrobou tepla. Pokud je hnědá tuková tkáň vystavována chladovým podnětům častěji, během akutní expozice také ochotněji vypomáhá svou netřesovou termogenezi [3, 62].

Časem si začne organismus na chlad zvykat, přizpůsobovat se chladným podmínkám. Svalový třes začíná postupně nahrazovat netřesová termogeneze. Pokud není nějaký mechanismus pro chladovou adaptaci a dlouhodobé zvyšování tělesné teploty v pořádku, může organismus za určitých okolností přežívat také díky procesům podobným reakcím na akutní stres [4].

### ***Chronický chladový stres***

Chronická adaptace na chlad se vyznačuje přechodem z třesové termogeneze na netřesovou. Expozice chladu (živočicha zvyklého na termoneutrální podmínky) trvající dlouhou dobu způsobuje v organismu změny na více úrovních.

Hlavní adaptací jsou zejména změny v hnědé tukové tkáni, které umožňují této tkáni produkovat teplo. Tento proces chladové adaptace v hnědé tukové tkáni se nazývá recruitment [3]. Předpokládá se, že změny vedoucí k recruitmentu působí nepřetržité vylévání noradrenalinu (význam noradrenalinu podrobněji dále v textu). Noradrenalin je již dlouho všeobecně uznávaným mediátorem pro hnědou tukovou tkáň. Není bez zajímavosti zmínit, že jsou ale k dispozici výsledky pokusů, které ukazují, že recruitment neovlivňuje pouze tento

hormon, alespoň u některých živočichů (viz např. pozdní novorozenecký recruitment u nidifugních mláďat [23] a recruitment vyvolaný krátkou fotoperiodou u křečka [24], vliv fotoperiody [5]).

Recruitment je dlouhodobý proces, při kterém se zvyšuje kapacita pro netřesovou termogenezi v hnědé tukové tkáni. Tvoří se malé multilokulární lipidové vakuoly, více mitochondrií, probíhá diferenciace, proliferace, inhibice apoptózy hnědých adipocytů, zvyšuje se krevní zásobení tkáně. Důležitým měřítkem recruitmentu je absolutní množství rozpřahujícího proteinu 1 (UCP1), který odráží jak koncentraci UCP1 v jednotlivých mitochondriích, tak počet molekul UCP1 na buňku [3, 39, 62]. Recruitovaná hnědá tuková tkáň vykazuje tedy větší připravenost k chladovým stimulům – je schopná ihned začít vyrábět teplo ve velkém množství. Pokud tato tkáň dlouhodobě není využívána, zase se zmenšuje (atrofie) [3].

Chronický chlad nepůsobí pouze na hnědou tukovou tkáň. Jeho vliv se projevuje také na jiných orgánech, které poskytují živiny, kyslík a jiné potřebné látky transportované do hnědé tukové tkáně. Během chladu roste vaskularizace hnědé tukové tkáně [3]. Udržovat tělesnou teplotu pomáhá také zlepšení izolace (hustější srst), zvýšený příjem potravy, zvýšení metabolického obratu nebo zvýšeného svalového třesu [4]. Podle některých současných studií je pro chronickou expozici chladu a s ní spojené adaptivní změny zásadně důležité vedle hnědé tukové tkáně i svalstvo (při absenci UCP1 se svalová aktivita zvyšuje a jedinec přežívá) [36]. Podle jiných studií chladově adaptovaní živočichové bez UCP1 nevykazují rozdíly ve svalové respiraci ve srovnání s kontrolními jedinci, a tudíž by svaly neměly být důležité pro adaptivní netřesovou termogenezi [63].

## **Hnědá tuková tkáň**

Hnědá tuková tkáň je hlavním orgánem pro netřesovou termogenezi hlodavců a dalších malých savců. Na rozdíl od všech dobře charakterizovaných savčích orgánů byla hnědá tuková tkáň odhalena poměrně nedávno – rozpřahující protein 1 (UCP1) a jeho význam pro produkci tepla se diskutuje posledních 40 - 50 let [3, 62]. Má pravděpodobně velký význam v evoluci savců, a tedy zřejmě i člověka. Pro svou schopnost spalovat živiny (hlavně tuky), a tím je přeměňovat na teplo, a nikoliv ukládat, byla v minulé době tato tkáň hlouběji zkoumána a je stále předmětem velkého zájmu pro potenciální možnost jejího uplatnění v terapii proti obezitě a s ní spojenými nemocemi.

Hnědou tukovou tkáň z organismu nelze odstranit, abychom pozorovali, co se děje za její nepřítomnosti, proto její výzkum není jednoduchý. Pro bližší poznání této tkáně se tedy používají nepřímé metody. Jednou z nich je metoda, při které je zablokován sympatický nervový systém ( $\beta$ -adrenergní receptory jsou blokovány propranololem), který hnědou tukovou tkáň inervuje, a tak je tato tkáň inaktivována [3]. Lepším modelem pro zkoumání hnědé tukové tkáně jsou geneticky upravené myši. Jeden z přístupů používá pro pokusy geneticky upravený kmen myši, které nemají funkční UCP1 [21] – nedochází u nich tedy k netřesové termogenezi. Další geneticky upravený kmen nemá hnědý tuk (za promotor UCP1 genu má vložený gen diphtheria toxin, jehož exprese tedy probíhá pouze v buňkách hnědé tukové tkáně, kde se exprimoval UCP1, a tyto buňky vlivem toxinu nepřežijí) [26, 27]. V současnosti se také pro studium hnědé tukové tkáně využívají informace získané pomocí metod magnetické rezonance [62] nebo pozitronové emisní tomografie [7].

### ***Typy tukové tkáně***

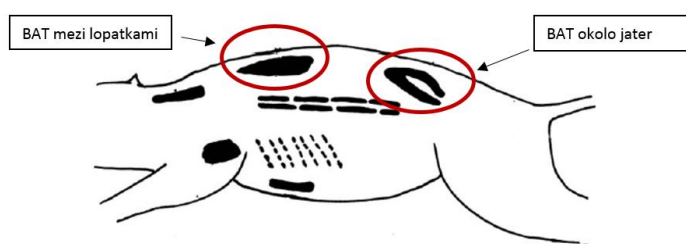
Tuková tkáň je klíčový metabolický orgán v těle savců (především malých savců). Existují dva typy této tkáně - bílá tuková tkáň (WAT) a hnědá tuková tkáň (BAT). Oba typy se liší funkcí, lokalizací v těle, morfologickou stavbou, ale i regulací, a mají společný pouze původ z mesenchymálních kmenových buněk. Bílá tuková tkáň slouží jako hlavní zásobárna triglyceridů, které jsou významným zdrojem energie. Hnědá tuková tkáň vyrábí teplo při expozici na chlad nebo při přejídání (tzv. chladově a stravou indukovaná termogeneze) [7]. V nedávné době byly objeveny tzv. běžové tukové buňky [11]. Tyto buňky se vyskytují ve WAT, podobají se bílým tukovým buňkám, ale jsou schopné reagovat na termogenní podněty zvýšenou expresí termogenních genů a zvýšenou spotřebou kyslíku. Tyto běžové buňky potřebují chladový stimul delší dobu, zatímco dospělé hnědé tukové buňky exprimují určitou základní hladinu UCP1 i bez stimulu [47]. Bílé adipocyty se mohou podle metabolických potřeb na běžové termogenní buňky přeměnit. Genová exprese těchto buněk se liší buď od bílých, nebo hnědých adipocytů. Jejich praktické využití by případně mohlo být v boji proti obezitě a s ní spojenými nemocemi [7].

### ***Umístění hnědé tukové tkáně v těle***

Hnědá tuková tkáň je rozmístěna na specifických místech v těle, konkrétní lokalizace se liší u jednotlivých druhů (výskyt u myši viz obrázek 2, u člověka viz obrázek 3).

Umístění hnědé tukové tkáně v těle [7]:

- interskapulární (především subkutánně na zádech mezi rameny, izolace je snadná)
- perirenální (okolo jater, izolace této tkáně není snadná)
- paravertebrální (periaortikální)
- axilární (v podpaždí)
- interkostální (mezi žebry) [3]

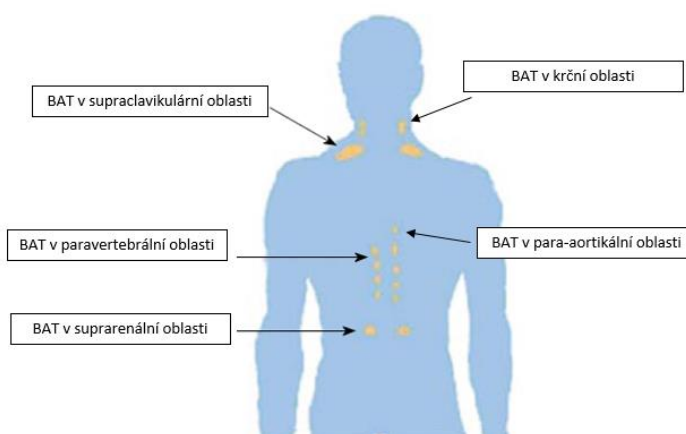


Obrázek 2: Umístění hnědé tukové tkáně v těle myši, v kroužku tkáň, které je přikládán největší význam [7] (upraveno z [3]).

U člověka se hnědá tuková tkáň nachází v rozsáhlejší množství pouze v novorozeném dítěti. Pokusy z nedávné doby (výsledky získané pomocí pozitronové emisní tomografie) potvrdily existence této tkáně i u dospělého člověka, ale pouze v omezené míře [7]. K bližšímu poznávání lidské BAT je zapotřebí dalších výzkumů.

Umístění hnědé tukové tkáně u dospělého člověka [12]:

- Cervikální
- Supraclavikulární
- Paravertebrální (v hrudníku)
- Suprerenální
- Para-aortikální



Obrázek 3: Umístění hnědé tukové tkáně v těle dospělého člověka (upraveno z [7]).

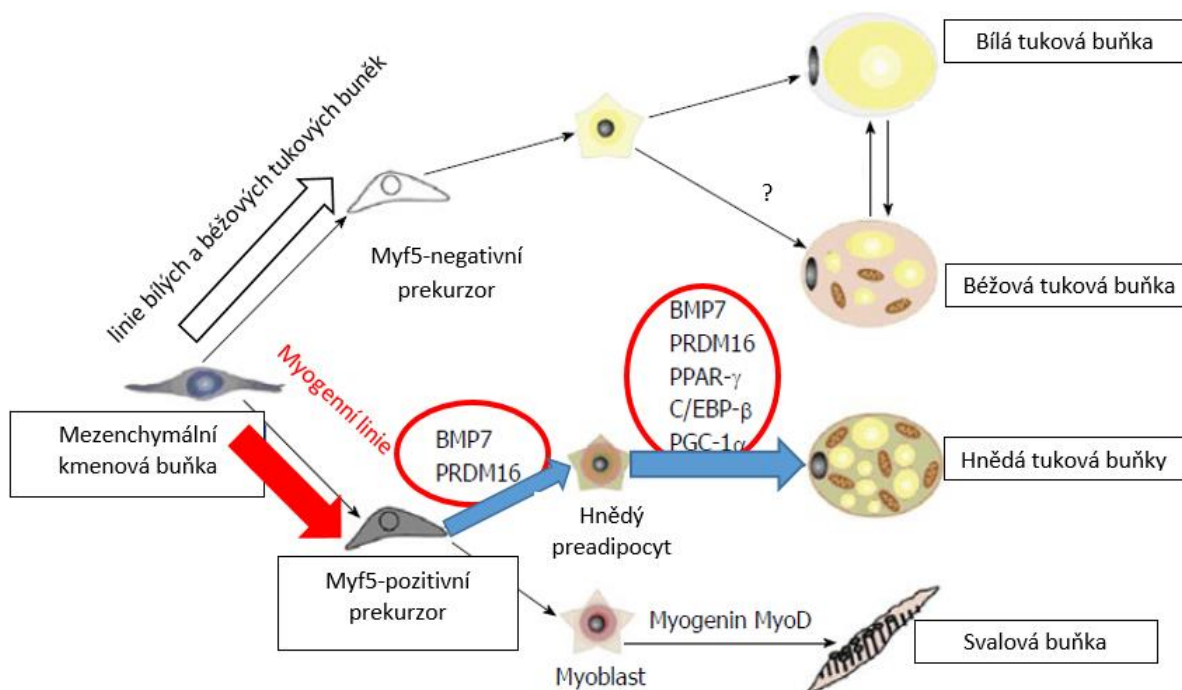
## Diferenciace hnědých adipocytů

Hnědá tuková tkáň se vyvíjí a diferencuje před narozením, protože po porodu má chránit bezbranné a od matky odloučené novorozeně před chladem (na rozdíl od bílých tukových buněk, které se začínají vyvíjet až po narození). Multipotentní mesenchymální kmenové buňky (kmenová buňky všech tukových typů) se vyvíjí v adipoblasty, následně v preadipocyty (už zde se dělí do dvou odlišných linií), preadipocyty dále proliferují. Následně buňky mohou začít diferencovat na dospělé buňky [7]. Během této konečné maturace začínají buňky vykazovat vždy pro daný typ adipocytu charakteristické rysy v metabolismu, morfologii, a také se začínají lišit intracelulárním obsahem - hromadí dostatečné množství triacylglyceridů (TGs)

v cytoplasmě [14]. Dospělé buňky linie hnědotukových buněk (myogenní linie) ztrácí možnost přeměny do buňky druhé linie (linie bílých a béžových tukových buněk) [15].

Buňky BAT i WAT pochází z mezodermy – mesenchymálních kmenových buněk. Z této linie se vyvíjejí prekurzory. Prekurzor vykazující expresi myogenního faktoru 5 (Myf5) iniciuje vznik myogenní větve (Myf5 pozitivní prekurzor), z které se kromě hnědých adipocytů vytváří také myoblast a posléze svalová buňka [17]. Prekurzor nevykazující expresi Myf5 (Myf5 negativní prekurzor) zahajuje vznik tukové linie a předchází vzniku bílého preadipocytu, z kterého se diferencuje buď bílá tuková buňka, nebo minoritně béžový adipocyt [7].

Z prekurzoru myogenní linie vzniká působením kostního morfogenetického faktoru 7 (BMP7) [18] a PR domény obsahující 16 (PRDM16) [19, 33] hnědý preadipocyt, a následně samotná dospělá hnědotuková buňka. PRDM16 a také protein vázající se do aktivační sekvence CCAAT  $\beta$  (C/EBP- $\beta$ ), pak iniciují expresi receptoru aktivovaného proliferátorem peroxisomů  $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) a koaktivátoru 1  $\alpha$  receptoru aktivovaného proliferátorem peroxisomů  $\gamma$  (PGC-1  $\alpha$ ), a tak spolupůsobí při diferenciaci na dospělou hnědotukovou buňku, a ne na svalovou buňku (viz obrázek 4) [20, 21, 33].

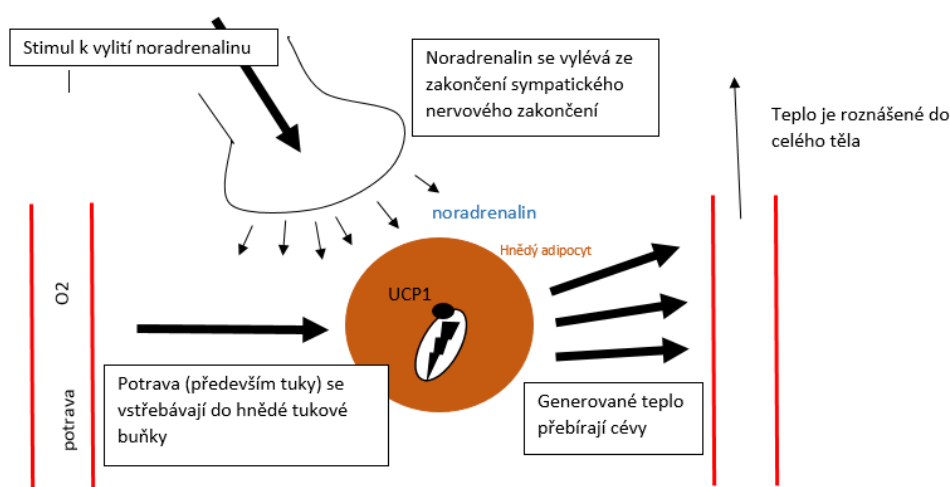


Obrázek 4: Vývoj hnědé tukové buňky: vývoj začíná z buňky mesenchymální kmenové za působení Myf5 - vznikne prekurzor, z kterého se vyvine BMP7 negativní linie předcházející svalovou buňku, a linie na BMP7 pozitivní směřující ke konečné maturaci do hnědé tukové buňky (upraveno podle [7]).

## Netřesová termogeneze

Klasická netřesová termogeneze je vázána především na hnědou tukovou tkáň – BAT. Netřesovou termogenezí se tedy nenazývá generování tepla bez třesu (např. vedlejší produkt respirace), tento způsob termogeneze nahrazuje svalový třes při dlouhodobé chladové adaptaci [3].

Hnědá tuková tkáň produkuje metabolické teplo v reakci na vystavení chladu, případně na zvýšení kalorického příjmu potravy. Tuto tkáň reguluje sympatický nervový systém (SNS) –



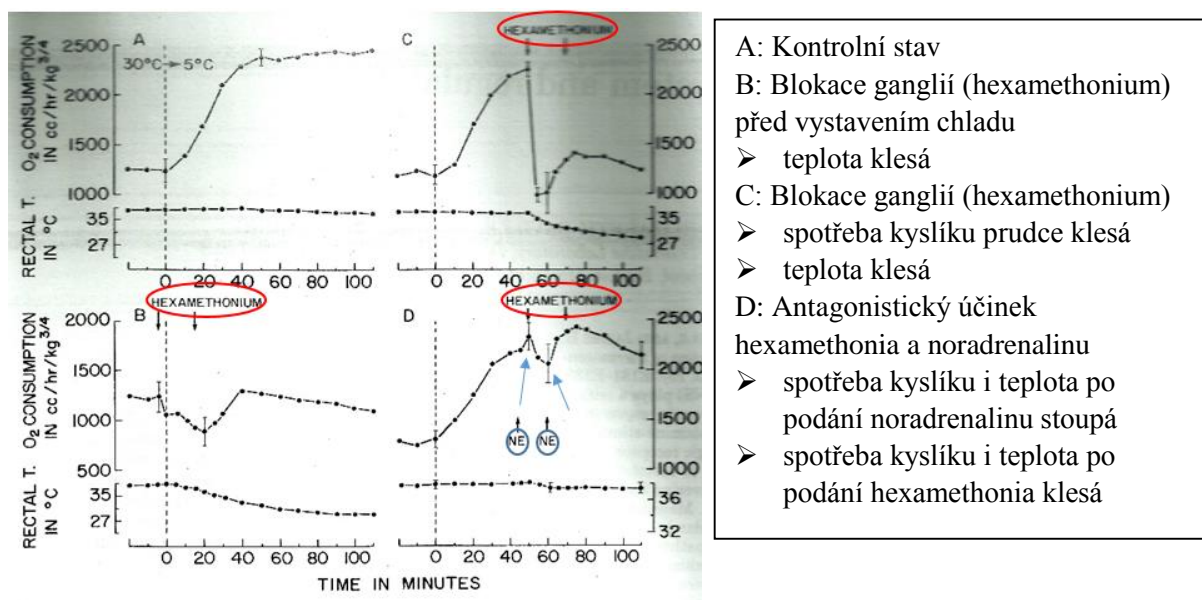
Obrázek 5: Schématické znázornění hnědé tukové buňky a jejích vztahů s okolím (upraveno podle [3]).

stimulace noradrenalinem v této tkáni se po vystavení chladu (či vysokotučné stravě) zvětšuje [2]. Esenciální enzym pro samotnou netřesovou termogenezi je rozpřáhací protein 1 (UCP1). Uvolněná energie ze spalovaných substrátů se tedy neprojeví výrobou energie ve formě molekuly ATP, ale uniká ve formě tepla. Substráty (potrava) a kyslík přichází do BAT cévami a také vyprodukované teplo odchází z buněk hnědé tukové tkáně do krevního oběhu (viz obrázek 5). U menších savců v normálním prostředí se na výrobu tepla tímto způsobem spotřebovává asi polovina přísunu energie (u živočichů žijících v chladných podmínkách je to ještě daleko větší podíl) [3].

## Regulace hnědé tukové tkáně

### Regulace na úrovni organismu:

Senzitivní chladové receptory v kůži vnímají chlad (reagují na pokles teploty). Informace je dále vedena do mozku, kde rozhodující signál o potřebě zvýšit produkci tepla vydává ventromediální jádro hypothalamu [28]. Signál je zprostředkován sympatickým nervovým systémem a projeví se výlevem noradrenalinu v hnědé tukové tkáni [29, 31]. Na obrázku 6 je znázorněn vliv chladu na zvýšení spotřeby kyslíku (panel A). Pokud jsou ganglia sympatiku zablokována, spotřeba kyslíku klesá (panel C – noradrenalin podán v průběhu chladové expozice) nebo vůbec nevzrůstá (panel B – noradrenalin podán před chladovou expozicí). Má-li zvíře zablokovaná ganglia, a zároveň se mu injikuje noradrenalin, sledujeme antagonistický účinek těchto dvou látek (panel D).



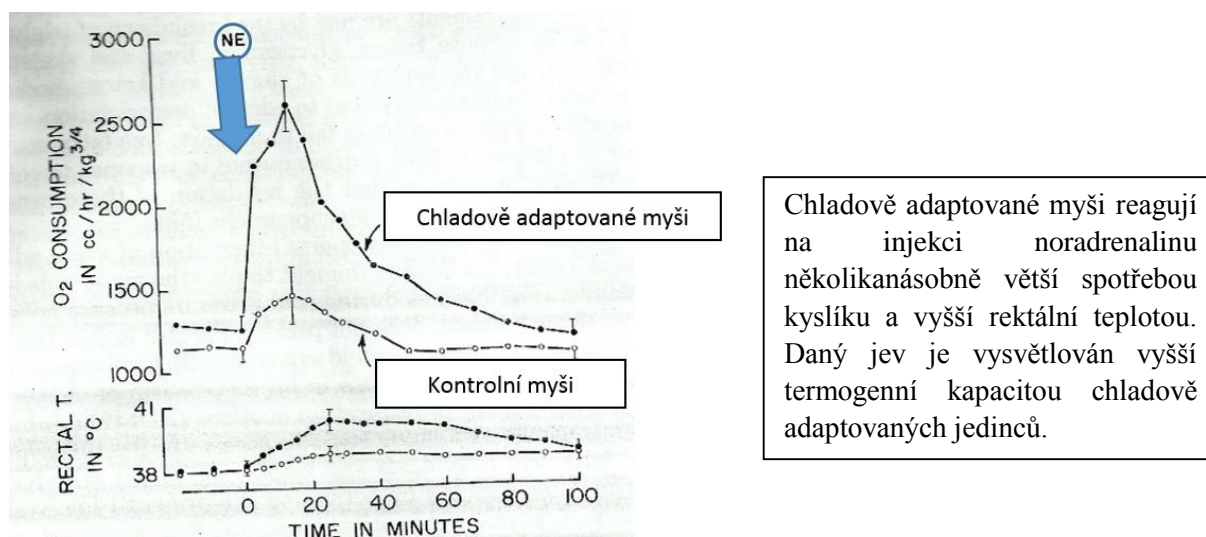
Obrázek 6: Spotřeba kyslíku a rektální teplota v závislosti na čase stráveném v chladu (5°C), bližší vysvětlení v tabulce vedle obrázku (upraveno z [2]).

### Regulace na buněčné úrovni:

Činnost hnědé tukové tkáně ovlivňuje více látek, nejdůležitější jsou ale katecholaminy. Na termoregulaci má rozhodující vliv noradrenalin uvolňovaný ze sympatického nervového systému. Vliv adrenalinu produkovaného dřením nadledvin je nižší. Hnědou tukovou tkáň tedy především stimulují nervy sympatiku [29, 30].



Schopnost hnědé tukové tkáně produkovat teplo závisí na aktuálním množství noradrenalinu v této tkáni a schopnosti hnědé tukové tkáně na noradrenalin reagovat – množství receptorů, aj. (aktivitý state), a zároveň na termogenní kapacitě dané tkáně v určitém čase (recruitment state) – schopnosti produkovat teplo [3]. Pro produkci tepla je také významné krevní zásobování, které ovlivňuje přísun kyslíku i substrátů. Termogenní kapacita odpovídá množství adipocytů a míře jejich diferenciaci (diferenciace vypovídá i o hustotě mitochondrií v buňkách a množství UCP1) a zvyšuje se dlouhodobým působením noradrenalinu. Noradrenalin působí stimulačně na proliferační a diferenciační mechanismy (dlouhodobým působením vzniká větší počet maturovaných adipocytů, a to podle stupně noradrenalinového působení). Stimulace noradrenalinem probíhá právě během expozice chladu. Myši, které jsou chladově adaptované



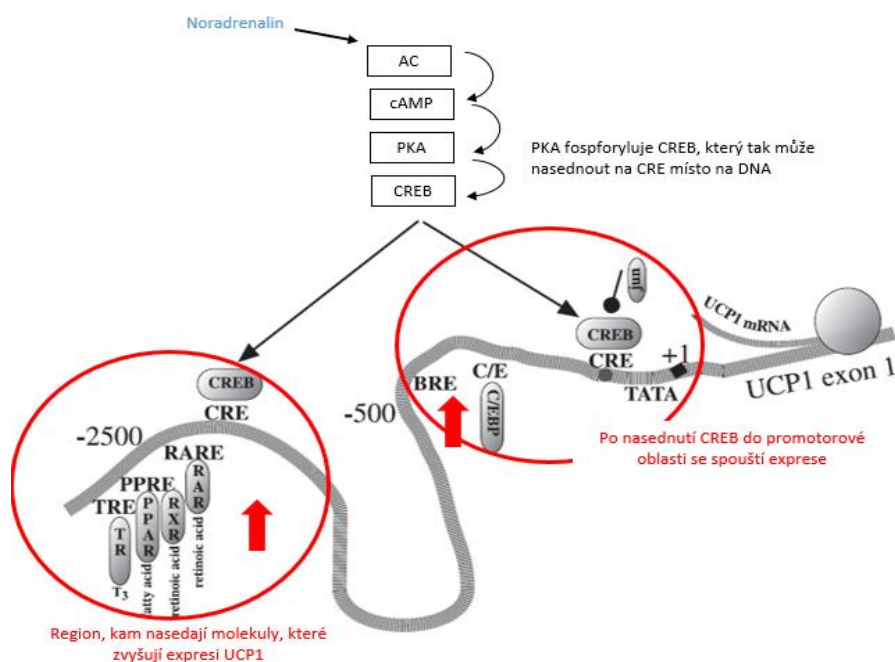
Obrázek 7: Spotřeba kyslíku a rektální teplota v závislosti na čase stráveném v chladu. Vidíme pozitivní efekt noradrenalinu a rozdíl u chladově adaptovaných a kontrolních myší (upraveno podle [32]).

(viz podkapitola Chronická chladová expozice), mají termogenní kapacitu vyšší a jejich reakce na noradrenalin je tedy daleko markantnější [32] (viz obrázek 7).

V hnědých preadipocytech noradrenalin nejprve indukuje proliferaci - přes  $\beta_1$ -adrenergní receptor a cyklický adenosinmonofosfát (cAMP) [34] snížením exprese transkripčních faktorů - proteinu vázajícího se do aktivační sekvence především v promotoru UCP1 genu C/EBP $\alpha$  [35, 7] a receptoru aktivovaného proliferátorem peroxisomů  $\gamma 2$  (PPAR  $\gamma 2$ ) [3, 7], což je důležité pro začátek proliferace, množení buněk. Postupně během proliferace a patrně spolupůsobením noradrenalinu se preadipocyty zvětšují na velikost maturované adipocyty, oba transkripční faktory se začínají exprimovat a buňky se diferencují [3,7]. V preadipocytech není exprimován

UCP1 a na noradrenalin preadipocyty reagují proliferací. Naopak maturované adipocyty se vyznačují expresí UCP1, při adrenergní stimulaci se diferencují. Pokud noradrenalin působí chronicky, UCP1 se exprimuje více a dochází k recruitmentu. (viz podkapitola Chronický chladový stres) [3].

Dospělé adipocyty jsou stimulované noradrenalinem cestou, která spouští fosforylaci proteinu vázajícího cAMP responzivní element (CREB), která buď vede k aktivaci exprese potřebných enzymů, nebo fosforylovaný CREB zvýší expresi dalších transkripčních faktorů, podporujících expresi enzymů důležitých pro diferenciaci [7] (dále viz Regulace přenosu signálu via  $\beta_3$  receptor). Důležitým transkripčním faktorem vznikajícím při stimulaci noradrenalinem je mimo C/EBP $\alpha$  také protein vázající se do aktivační sekvence C/EBP $\beta$  [35], a dále stoupá exprese koaktivátoru receptoru aktivovaného proliferátorem peroxisomů  $\gamma$  1 (PGC-1) [38]. Pro iniciaci exprese UCP1 aktivovaný CREB nasedá na cAMP responzivní element (CRE) a dále pro zvýšení jeho produkce jsou kromě CREB a C/EBP potřeba další aktivátory. Jsou popsány dvě regulační oblasti, kam se tyto aktivátory váží. Na promotorovou část se váže CREB a v jeho blízkosti také C/EBP. Další oblast je komplexní oblast zvyšující aktivaci vzdálená od promotoru u potkana 2500 pb downstream. Na tuto oblast se do více míst váže retinová kyselina, která zvyšuje expresi UCP1 při diferenciaci. Dále je zde vazebné místo pro thyroideální hormon, který svojí přítomností ruší represorové účinky tohoto místa na DNA a amplifikuje tak



Obrázek 8: Regulace exprese UCP1 - transkripční faktor CREB a další aktivátory a jejich místo působnosti (upraveno podle [3]).

efekt noradrenalinu na transkripci UCP1, dále PPAR  $\alpha$  nebo PPAR  $\gamma$ , které jsou nezbytné pro diferenciaci (viz shrnující obrázek 8) [3, 7].

Noradrenalin ovlivňuje také životaschopnost buňky. Během chladu se vylévá více noradrenalinu ze sympatického nervového systému a ten inhibuje apoptózu buněk v hnědé tukové tkáni [37, 39]. Noradrenalin působí proti apoptóze přes  $\beta$ - a  $\alpha_1$ -adrenergní receptory jednak zvýšením hladiny cAMP – cAMP dráha, která spouští mitogeny-aktivovanou protein kinasovou (MAPK) dráhu Erk1/2 (Erk1/2 je tímto nafosforylována, a tedy aktivována), ale také zvýšením intracelulární koncentrace cAMP a  $\text{Ca}^{2+}$  [37, 40]. Noradrenalin také stimuluje expresi basického fibroblastového růstového faktoru (bFGF), který inhibuje apoptózu fosforylací kinasy regulované extracelulární signalizací (MEK), která opět aktivuje Erk1/2 dráhu [37]. Apoptické účinky má tumor nekrotický faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), noradrenalin zřejmě stimuluje produkci oxidu dusnatého NO, který pak indukuje rezistenci proti TNF $\alpha$ -indukované apoptóze, pravděpodobně přes protein teplotního šoku 70 (HSP70) [41]. Snížení apoptózy podporuje hyperplazii hnědé tukové tkáni.

### ***Adrenergní receptory v hnědých tukových buňkách***

V hnědé tukové tkáni savců se vyskytují  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ - i  $\beta$ -adrenergní receptory.

#### *$\beta$ -Adrenergní receptory*

Adrenergní receptor  $\beta_1$  ( $\beta_1$ -AR) se vyskytuje hlavně v hnědých preadipocytech, kde zprostředkovává signál pro proliferaci a postupnou maturaci buněk [3]. Podle určitých studií se vyskytuje i v maturovaných hnědotukových buňkách, kde se exprese genu pro  $\beta_1$ -AR rozběhne po chladové stimulaci  $\beta_3$  adrenergního receptoru ( $\beta_3$ -AR) - hladina transkriptu  $\beta_1$ -AR radikálně stoupne [42]. V dospělých buňkách celkově ale není význam  $\beta_1$ -AR pro přenos adrenergní signalizace jednoznačný a pravděpodobně se jeho význam liší u jednotlivých druhů [58]. V některých případech, pokud nedochází k expresi  $\beta_3$ -AR, může jejich funkci vyrovnávat právě  $\beta_1$ -AR (u člověka [4]). Některé starší experimenty docházejí k výsledkům, které jeho významnější roli popírají [58], jiné novější práce přisuzují klíčovou roli v chladem indukované termogenezi právě  $\beta_1$ -AR (i u myši [8]).

Metody zkoumající obecně vliv receptorů jsou zajímavé, pro lepší přehled tato práce představuje tři postupy pro výzkum adrenergních receptorů. Jednou metodou je výzkum lidských multipotentních tukových kmenových buněk (hMADS), které mohou být stimulovány přes  $\beta_1$ - i  $\beta_3$ -adrenergní receptor – oba zprostředkovávají signál pro zvýšení cAMP [4]. Pro výzkum je také využíván agonista (pro  $\beta_1$ -AR – dobutamin, pro  $\beta_3$ -AR - CT-316243) nebo se

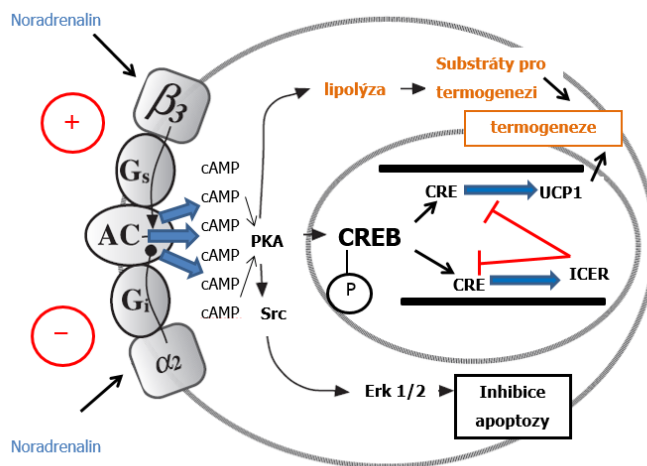
opět dělají pokusy na geneticky upravených myších -  $\beta_3$ KO kmen (myš bez  $\beta_3$  receptoru). Adrenergní stimulovaná termogeneze u  $\beta_3$ KO kmenu odpovídá adrenergní termogenezi přes  $\beta_1$ -AR. Evoluční výhodou  $\beta_3$ -AR vůči  $\beta_1$ -AR je schopnost déle udržet signál pro netřesovou termogenezi (u  $\beta_3$ KO hladina cAMP klesá už po 30 minutách, zatímco u normální myši s  $\beta_3$ -adrenergním receptorem až po 90 minutách) [4]. Význam  $\beta$ -adrenergních receptorů se stále zkoumá a pro další výzkum adrenergní stimulace bude nutné postavení jednotlivých podtypů v hnědých tukových buňkách objasnit, především  $\beta_1$ -AR a  $\beta_3$ -AR, protože  $\beta_2$ -AR se v hnědých tukových buňkách téměř nevyskytuje [42].

$\beta_3$ -AR je u myši ve zralých buňkách hnědé tukové tkáně považován stále ještě za nejdůležitější a pravděpodobně právě on zprostředkovává signál pro potřeby netřesové termogeneze. Pro zkoumání  $\beta_3$ -AR se používá, jak již bylo zmíněno, jeho agonista CT-316243, který je v současné době asi nepoužívanější (např. pro pozorování potenciálního recruitmentu v bílé tukové tkáni [59]). Charakteristickou vlastností  $\beta_3$ -AR je také malá specifita k obecnému  $\beta$  antagonistovi, kterým je propranolol.  $\beta_3$  se od ostatních  $\beta$ -adrenergních receptorů liší absencí většiny aminokyselin potřebných pro jejich desenzitizaci, ale tento strukturní rozdíl patrně v regulaci netřesové termogeneze nehraje klíčovou roli [3]. Jednoznačný funkční rozdíl  $\beta_3$ -AR od ostatních  $\beta$ -adrenergních receptorů, stále zůstává otázkou a je možné, že jeho významnost bude v blízké době zpochybněna.

#### *Přenos signálu v buňce via $\beta_3$ receptory*

$\beta_3$  adrenergní receptor aktivuje stimulační G protein - podtyp  $G_s$  ( $G_s\alpha_L$ ,  $G_s\alpha_S$ ). Během vývoje v maturované adipocyty se množství  $G_s\alpha_S$  zvyšuje, ale význam vzrůstu není znám.

Noradrenalin aktivuje prostřednictvím  $\beta_3$  receptoru a  $G_s$  proteinu adenylátcyklasu (AC). Tento enzym generuje cAMP, které množí adrenergní signál a slouží jako druhý posel pro další buněčné odpovědi. AC existuje více isoform, které jsou exprimovány také v hnědé tukové tkáni. Jedním kandidátem na zásadní isoformu AC je už dlouhou dobu AC3 [43]. Absence AC3 dokonce koreluje



Obrázek 9: Působení noradrenalinu stimulačně přes  $\beta_3$ -receptor a inhibičně přes  $\alpha_2$  receptory. Upraveno podle [3].

podle určitých výzkumů s obezitou, ale klíčová úloha AC3 nemusí být ještě proto v hnědé tukové tkáni a pravděpodobně také není. Význam AC3 se zdá být hlavní v hypothalamu, v řídícím centru pro termoregulaci a regulaci tělesné váhy [60]. Na základě pokusů s lidskými  $\beta_3$  receptory se zjistilo, že mohou stimulovat také inhibiční  $G_i$  proteiny a MAPK dráhu. Aktivace  $G_i$  tedy inhibuje tvorbu cAMP, a tedy snižuje účinky noradrenalinu [3].

cAMP aktivuje proteinkinasu A (PKA). PKA fosforyluje různé substráty a tím dál předává adrenergní signál. Fosforylací proteinu CREB [44] – transkripčního faktoru, se rozbíhá exprese genů (včetně UCP1 (viz výše) a ICER [45]). ICER je transkripční represor, který nasedá na stejné místo jako CREB a brání tak dalšímu pokračování CREB aktivace – účinek noradrenalinu je tedy přechodný. Dále na dráze zprostředkované PKA dochází nepřímo k aktivaci Src, která vede k aktivaci Erk1/2 cesty (typ MAPK dráhy), což vede k inhibici apoptózy (viz obrázek 9). Další aktivovanou MAPK dráhou je p38, která je potřebná pro stimulaci exprese UCP1. Aktivované nejsou jen jaderné, ale i cytosolické proteiny významné pro aktivitu hnědé tukové tkáně (např. protein fosfoprotein regulovaný dopaminem a cAMP (DARPP), který prodlužuje dobu aktivace – inhibuje fosfatasy) (shrnuť v [3]). Aktivace lipolýzy probíhá také prostřednictvím cAMP a PKA (viz podkapitola Lipolýza).

#### *$\alpha_1$ -Adrenergní receptory*

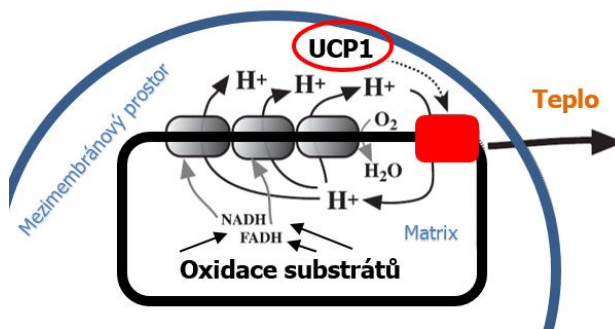
$\alpha_1$  (především  $\alpha_{1A}$ ) receptor je také exprimován v hnědých tukových buňkách a podílí se na jejich regulaci [55]. Účinek  $\alpha_1$  receptoru spočívá především ve zvýšení intracelulární hladiny  $Ca^{2+}$  a v určité výpomoci při fosforylaci transkripčních faktorů (CREB) [44, 61].  $\alpha_1$  receptor stimuluje  $G_q$  protein, který působí na fosfolipázu C (PLC). PLC štěpí  $PIP_2$  (fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát) na DAG (1,2-diacylglycerol) a  $IP_3$  (inositol-1,4,5-trifosfát).  $IP_3$  působí pravděpodobně i v hnědé tukové tkáni na vylití  $Ca^{2+}$  hlavně z buněčných rezerv (endoplazmatické retikulum, ale snad i z okolí buňky) spolu s působením dráhy vedoucí od  $\beta$  receptorů [44]. Zvýšená intracelulární hladina  $Ca^{2+}$  je pravděpodobně nezbytná pro zvýšení hladiny  $Ca^{2+}$  v mitochondrii, ke které opravdu během adrenergní stimulace dochází. Zvýšená koncentrace  $Ca^{2+}$  ale také aktivuje fosfodiesterasu, která štěpí cAMP na adenosinmonofosfát (AMP) – v tomto případě tedy jde  $\alpha_1$  dráha proti  $\beta_3$  dráze, která naopak zvyšuje hladinu cAMP [3]. Druhý produkt štěpení PLC - DAG fosforyluje proteinkinasu C (PKC), která aktivuje transkripční faktor CREB [44]. Přímý efekt  $\alpha_1$  stimulované dráhy na hnědou tukovou tkáň (termogenezi) je přibližně 10 %, tedy minoritní [3].

### *$\alpha_2$ -Adrenergí receptory*

Agonista  $\alpha_2$  receptoru injikovaný do sympatických nervů inervující hnědou tukovou tkáň negativně koreluje s rozvojem termogeneze v této tkáni [56]. Mechanismus stimulace je přes  $G_i$  proteiny (především  $G_{i\alpha 2}$ ), které následně inhibují AC – působí tedy proti  $G_s$ , který je stimulován  $\beta$  receptory (viz obrázek 9). Charakter odpovědi závisí tedy na poměru množství  $\beta$  a  $\alpha_2$  receptorů, který sama buňka může ovlivňovat (je to pro ni výhodné) [3].

### ***Uncoupling protein 1***

Netřesová termogeneze probíhá za současného působení rozpráhujícího proteinu (UCP1) a lipolytických enzymů, které dávají k dispozici substráty pro oxidaci a aktivují samotný UCP1. Substráty pro oxidaci v podobě  $NADH + H^+$  a  $FADH_2$  přicházejí do dýchacího řetězce, kde jsou oxidovány. Energie, která z oxidačních reakcí vzniká, je použita na přepumpování  $H^+$  do mezimembránového prostoru mitochondrií a vzniká tak protonový gradient. Protonový gradient během netřesové termogeneze není využit na výrobu ATP (jak je tomu během dýchání), ale generuje teplo. Jinými slovy energetický potenciál, který v sobě protonový gradient nese, není přeměněn na chemické vazby a z této nevyužité energie vzniká teplo jako vedlejší produkt (viz obrázek 10). Mimo význam UCP1 v termogenezi je tento protein významný pro snižování oxidačního stresu [25].



*Obrázek 10: Funkce UCP1 - gradient  $H^+$  není využit na tvorbu chemických vazeb, přechází přes vnitřní membránu mitochondrie do matrix a nevyužitá energie se uvolňuje v podobě tepla. Upraveno podle [3].*

UCP1 rozpráhuje oxidativní děje v respiračním řetězci od ATPsyntasy a nevyužitá energie přeměněná na teplo odchází z buňky a následně prostřednictvím krevního řečiště z tkáně do celého těla. Podle určitých studií existuje termogenní odpověď na noradrenalin i v nepřítomnosti UCP1, ale tato termogenní odpověď pravděpodobně nepodléhá chladové adaptace. UCP1 je jediný protein, který zprostředkovává adaptivní adrenergí netřesovou termogenezi [21]. Mnohé studie také ukazují, že UCP1 nemusí být jediným rozpráhujícím proteinem, nebo dokonce že existují jiné mechanismy netřesové generace tepla během expozice chladu. Výzkum netřesové termogeneze tedy může přinést ještě mnoho nových poznatků.

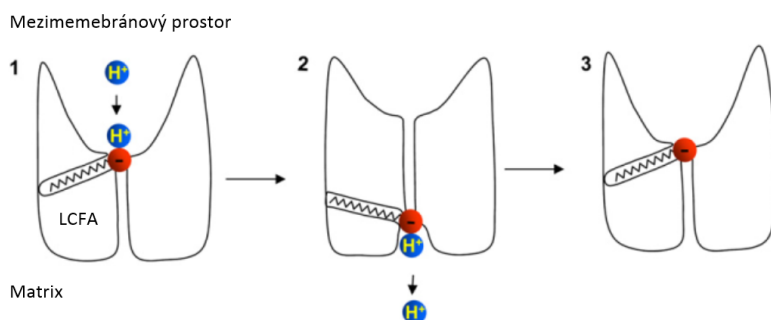
Dříve byly navrhovány jiné mechanismy pro netřesovou termogenezi (vlastě pro fungování UCP1) v hnědé tukové tkáni. Jedním z modelů bylo „plýtvání“ s ATP: V tomto případě byla představa taková, že ATP se nejprve nasyntetizuje a pak např. prostřednictvím  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPázy se vytvořená energie v chemických vazbách přemění rozpojením makroergní vazby ATP na teplo. Další výzkum ale tyto úvahy nepotvrdil, jelikož inhibice ATP syntasy vedla pouze k částečnému snížení termogeneze, a naopak se objevovalo stále více důkazů pro netřesovou termogenezi - oxidaci probíhající bez ATP syntasy [3].

UCP1 (také nazývaný termogenin) je membránový enzym asi 33 kDa velký. Váže GDP, ATP i ADP a patří do rodiny mitochondriálních přenašečových proteinů, se kterou také sdílí řadu konzervovaných sekvencí. Mezi základní charakteristiky UCP1 patří přítomnost tří molekul prolinu (každá na jednom z tripletů u sekvencí jdoucích do mitochondriální matrix), a dále úsek vázající nukleotidy (obsahují ho také příbuzné UCP2 a UCP3). Smyčka druhého z tripletů a C-koncová část proteinu obsahují jedinečné sekvence pro UCP1, jejich význam ale ještě není objasněn [3, 25]. UCP1 gen existuje ve více alelách, polymorfismus tohoto genu pravděpodobně může odpovídat za větší náchylnost některých jedinců k rozvoji obezity [64].

Samotný UCP1 nemusí být nutně v hnědé tukové tkáni exprimován, důležitá je schopnost buněk jeho případné exprese. UCP1 může být také exprimován mimo buňky hnědé tukové tkáně (bílá tuková tkáň, savčí slinivka, skeletární svalovina, hovězí sítnice, některé typy hladké svaloviny u člověka, myší thymocyty). Role UCP1 v těchto tkáních však není stále ujasněná [25]. Během inaktivace jsou na UCP1 způsobem navázány nukleotidy. Přesný mechanismus, jakým nukleotidy UCP1 inaktivují, a místo, kam se nukleotidy váží na UCP1, není zatím znám [54]. K aktivaci UCP1 jsou naopak potřeba mastné kyseliny (MK). Regulace transportu protonů a samotný mechanismus transportu a role MK při něm byly v poslední době dosti intenzivně zkoumány a nakonec poměrně uspokojivě objasněny. Před objasněním mechanismu se nabízel více zajímavých možností, jak transport protonů vysvětlit. Jedna z teorií považovala MK za allosterické aktivátory – po navázání MK se změnil konformace UCP1, nemůže se navázat GDP a protony mohou procházet. MK byly považovány také za kompetitivní aktivátory proti navázání GDP. Dalším navrhovaným modelem bylo působení MK jako kofaktoru, který by se navázal do kanálu pro protony a umožnil by tak jejich průchod. Pro ani jeden z těchto způsobů ovládní ale nebyly uspokojivé důkazy. Třetím vysvětlením pro součinnost MK a UCP1 byla člunková teorie předpokládající ještě úplně jiný přenašeč pro protony spojenými v jednu molekulu s MK (nedisociovaná MK). UCP1 by pak fungoval pouze jako přenašeč MK v aniontové formě [46]. Pro tuto teorii bylo více důkazů, problém spočíval ale v tom, že by



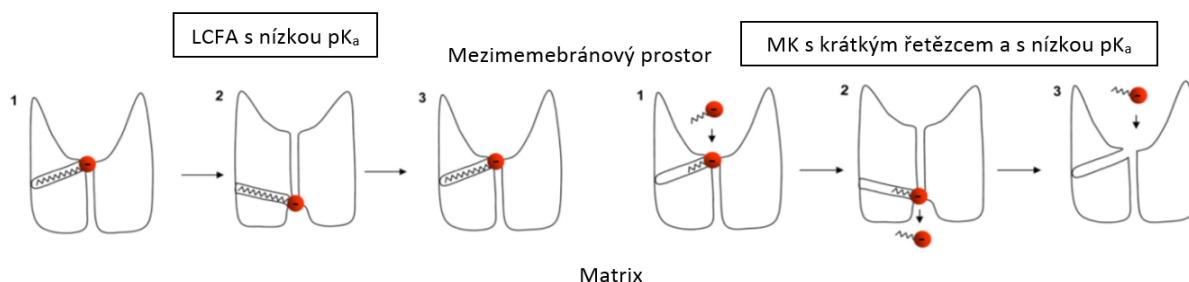
k tomuto transportu nebyl potřebný UCP1 – stačily by jiné přenašeče pro MK. Význam GDP inhibičních účinků v tomto modelu také nebyl vyřešen [3]. V roce 2012 se objevila práce, která svým způsobem na poslední člunkovou teorii navazuje, a její výsledky a navrhovaný model, ač také uspokojivě nevysvětluje inhibiční aktivitu nukleotidů, se zdají být velmi pravděpodobné [54]. Tento model je založený na nezbytné aktivaci UCP1 aniontem mastné kyseliny s dlouhým



Obrázek 11: Mechanismus přenosu  $H^+$  pomocí UCP1, nezbytná aktivace aniontem dlouhé mastné kyseliny (LCFA). Podrobnější vysvětlení viz text. Převzato a upraveno z [54].

řetězcem ( $LCFA^-$  – long chain fatty acid). UCP1 funguje jako symporter, přičemž transportována je během jednoho cyklu 1 molekula  $LCFA^-$  a 1 ion  $H^+$ .  $LCFA^-$  se naváže na UCP1 z cytosolické strany (na konec domnělé prohlubně), tato vazba je udržována hydrofobními interakcemi mezi nenabitým koncem  $LCFA^-$  a UCP1. Na  $LCFA^-$  se naváže  $H^+$  (navázání je podmíněno přítomností  $LCFA^-$  v UCP1) (obrázek 11 – stav 1).  $LCFA^-$  a  $H^+$  se společně se přenesou pomocí UCP1, který se konformačně změní, do matrix.  $H^+$  oddisociuje a  $LCFA^-$  zůstává v UCP1 (obrázek 11 – stav 2). UCP1 změní konformaci a navázaná  $LCFA^-$  se vrací do mezimembránového prostoru (obrázek 11 – stav 3).

Přenos  $H^+$  spolu s  $LCFA^-$  do matrix je tedy elektroneutrální. Přenos  $H^+$  je závislý na rozdílu pH, délce  $LCFA^-$  a její  $pK_a$ . Ve velmi vysokém pH  $H^+$  není transportován, v nízkém pH zase  $H^+$  od UCP1 a  $LCFA^-$  neoddisociuje. Při malém  $pK_a$  a dlouhém řetězci nedochází k přenosu  $H^+$ ,



Obrázek 12. UCP1 a mastné kyseliny s nízkou  $pK_a$  ( $H^+$  není transportován) a rozdílně dlouhým řetězcem. LCFA (MK s dlouhým řetězcem) je v UCP1 udržována vlivem hydrofobních interakcí, MK s řetězcem krátkým v mitochondriální matrix oddisociuje (viz text). Převzato a upraveno z [54].



ale LCFA<sup>-</sup> zůstává v UCP1. Pokud pK<sub>a</sub> zůstává malé, H<sup>+</sup> transport stále neprobíhá, ale vlastní LCFA<sup>-</sup> (nebo vlastně pouze krátká MK) oddisociuje, protože hydrofobní interakce nejsou tak silné a MK v UCP1 neudrží (shrnutí z [54], viz obrázek 12).

Hlavní příbuzné proteiny UCP1 jsou UCP2 a UCP3. UCP2 rozpřahuje protonový gradient od ATPsyntasy pouze za určitých podmínek (např. ve vysoké koncentraci UCP2 [3]). V hnědé tukové tkáni se UCP2 nevyskytuje, ale je exprimován v plicích, žaludku, slezině a bílé tukové tkáni, jeho exprese je indukována pravděpodobně oxidačním stresem [57]. Podle určitých studií UCP3 také působí jako UCP1, ale vyskytuje se oproti UCP1 a UCP2 hlavně ve svalech [47, 48]. Jeho význam v termogenezi pravděpodobně ale nebude tak velký, protože při absenci tohoto proteinu myš nevykazovala problémy s termoregulací. Další funkcí UCP3 je také schopnost ve svalech snižovat oxidační stres [47, 48]. Oba proteiny se pravděpodobně také určitým způsobem podílejí na energetickém metabolismu, neboť jejich výskyt je asociován s obezitou. Studie zaměřené na výzkum UCP proteinů v poslední době stále probíhají a naše znalosti v tomto směru nejsou ještě úplné.

### ***Substráty pro netřesovou termogenezi***

Pro termogenezi v hnědé tukové tkáni je UCP1 nezbytný. Pro iniciaci tohoto děje jsou ale zapotřebí také nějaké substráty – v případě netřesové termogeneze především mastné kyseliny, které jsou uvolňovány z lipidů, a podle některých studií i glukóza. Během chladové expozice je příjem mastných kyselin i glukózy hnědou tukovou tkání vyšší než v jiných tkáních (shrnutí v [49]).

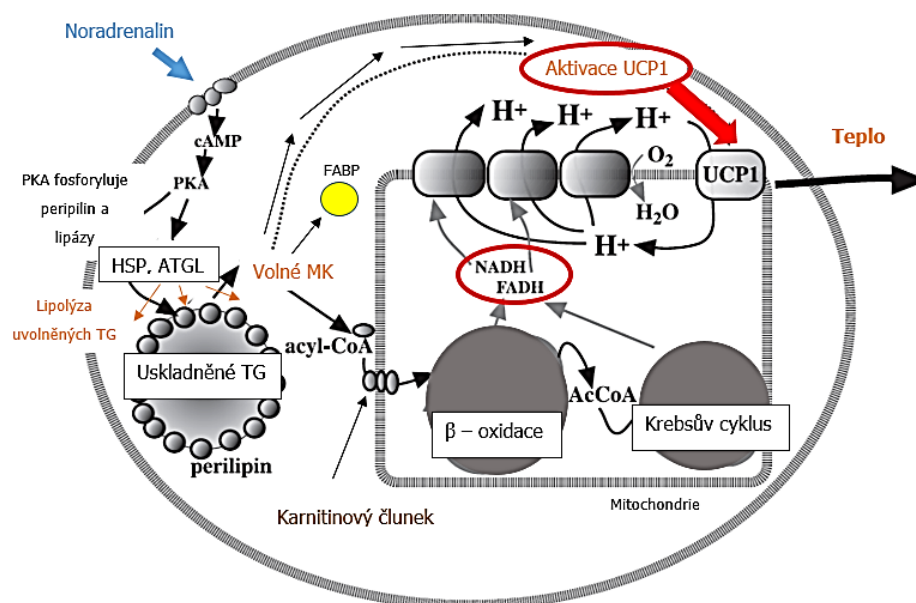
*Tabulka 1: Cesty glukózy a mastných kyselin v hnědé tukové buňce. Upraveno podle [49].*

GLUKOZA	SKLADOVÁNÍ (Glykogen)
	DE NOVO LIPOGENEZE (TG)
	OXIDACE
MASTNÉ KYSELINY	SKLADOVÁNÍ (TG)
	AKTIVACE UCP1
	OXIDACE

Zvýšený příjem glukózy během chladové expozice potvrzuje i větší množství jejích přenašečů (zvláště glukozový transportér GLUT4) [49]. Význam glukózy pro netřesovou termogenezi naznačuje i zvýšená exprese enzymů spojených s metabolismem glukózy a enzymů pro de novo lipogenezi z glukózy během chladové expozice [51].

Hlavní zdroj substrátů pro oxidaci v hnědé tukové tkáni jsou mastné kyseliny uvolněné z tuků. Lipolýza je v hnědé tukové tkáni spuštěna noradrenalinem (přes  $\beta_3$  receptor  $\rightarrow$  AC  $\rightarrow$  cAMP  $\rightarrow$  snad i přes PKA), iniciaci lipolýzy můžeme chápat už jako součást termogeneze. Podle posledních experimentů jsou dokonce volné mastné kyseliny (konkrétně mastné kyseliny s dlouhým řetězcem) pro aktivaci UCP1 nezbytné [54]. Mastné kyseliny se do buňky dostávají uvolněné z triglyceridů (TG), extracelulární lipolýzu zabezpečují lipoprotein lipasy (LPL). Lipasy štěpí esterové vazby v molekule lipidu za vzniku glycerolu a volných mastných kyselin. Volné mastné kyseliny prochází skrz buněčnou membránu pomocí specifických translokátorů (např. translokátor CD36 nebo transportér mastných kyselin (FATC)), pokud některý z těchto přenašečů chybí, buňka není schopná produkovat dostatečné množství tepla netřesovou termogenezi během chladové expozice a jediným východiskem je pro ni svalový třes (shrnutí v [49]). V buňce jsou mastné kyseliny buď skladovány v multilokulárních tukových kapénkách (esterifikované v triglyceridech), nebo rovnou transportovány do mitochondrie a svoji vazbou na UCP1 (z cytosolické strany) tento protein aktivují. Před lipolýzou triglyceridů uskladněných v tukových kapénkách je potřeba (experimentálně dokázáno z bílé tukové tkáně) především uvolnit je z kapének, kam se shlukují a které jsou obaleny perilipinem, který brání vniku lipáz i zvýšení bazálního metabolismu lipidů. Perilipin je třeba fosforylovat a tuto reakci pravděpodobně zabezpečuje PKA [3]. Fosforylovaný perilipin změní konformaci a umožní vstup lipáz (především hormon senzitivní lipasa (HSL)), ale také ATGL (tuková triglyceridová lipasa) a MGL (monoglyceridová lipasa) aktivovaných také pomocí PKA [49]. Mastné kyseliny musí být dostatečně dlouhé a patřičně nasycené, pokud tyto požadavky nesplňují – musí být upraveny (např. pomocí enzymů pro elongaci (ELOVL3)) a vznikají tak mastné kyseliny s velmi dlouhým řetězcem (very long-chain fatty acid). Typickou mastnou kyselinou pro hnědou tukovou tkáň je např. palmitoleová (16:1) a linolová kyselina (18:2). Složení mastných kyselin v tukové tkáni je rozdílné u štíhlého a obézního jedince [52].

Většina volných mastných kyselin po lipolýze zůstává v cytoplazmě, kde jsou napojeny na proteiny vázající mastné kyseliny (FABP). FABP fungují podobně jako chaperony, v hnědé tukové tkáni je jich exprimováno více druhů (pro hnědou tukovou tkáň jsou pravděpodobně nejzajímavější FABP 3, 4, 5). FABP 4 se v hnědých adipocytech vyskytuje nejhojněji, exprese FABP 3 je výrazně (10 x) zvýšena během chladové expozice [53]. Další cesta mastných kyselin směřuje přes karnitinový člunek do mitochondrie, kde buď podléhají samotné oxidaci podobně jako v jiných buňkách ( $\beta$ -oxidace, Krebsův cyklus) a poskytují tak redukované koenzymy NADH +  $H^+$  a FADH<sub>2</sub> do dýchacího řetězce, nebo hrají roli v regulaci UCP1 (viz obrázek 13).



Obrázek 13: Lipolýza TG po noradrenalinovém stimulu a účinky volných MK na netřesovou termogenezi. Bližší vysvětlení viz text (upraveno podle [3] a [49]).

Zajímavé je, že hnědá tuková tkáň není závislá na dodávání substrátů pro oxidaci z bílé tukové tkáně nebo jater, pokud organismus přijímá dost potravy. Pokud ale hladoví, energie se z bílé tukové tkáně a jater odebírá [49].

Mastné kyseliny mohou sloužit také jako signální molekuly nebo jako ligandy pro ještě jiné proteiny než UCP1. Pro netřesovou termogenezi také velmi významné receptory aktivované proliferátorem peroxisomů (PPARs). PPAR mají vazebné místo v oblasti blízko genu pro koaktivátor receptoru aktivovaného proliferátorem peroxisomů (PGC1  $\alpha$ ) a UCP1. Vedle významného transkripčního faktoru CREB (který působí po adrenergní stimulaci (viz podkapitola Regulace na buněčné úrovni) umožňuje expresi těchto genů. PPAR v hnědé tukové tkáni představuje důležité propojení informací o množství mastných kyselin a jeho spotřebě, eventuálně skladování – větší množství mastných kyselin, stoupá aktivovaných PPAR, exprimuje se více enzymů pro metabolismus mastných kyselin a více mastných kyselin je oxidováno (shrnuť v [49]).

## Závěr

Chladová adaptace je velmi složitý proces, ve kterém adrenergní stimulace hraje velice důležitou, ne však jedinou roli. Na rozvoji netřesové termogeneze indukované chladem nebo zvýšeným příjmem potravy se mimo sympatického nervového systému řízeného z hypothalamu podílí celá řada orgánů, které přispívají k udržování celkové energetické homeostázy různými faktory (prozkoumané jsou především faktory se vztahem k obezitě, jako např. irizin ze svalů, katecholaminy z imunitních buněk, žlučové kyseliny z jater, atriální natriuretické peptidy ze srdce, aj.) [6].

Výzkum hnědé tukové tkáně, velmi důležitého orgánu pro chladovou adaptaci, se v poslední době zaměřuje na výzkum netřesové termogeneze a jejích disipačních schopností. Přitom byly postupně zjištěny dlouho hledané, zajímavé a někdy překvapivé výsledky, které otvírají široké obzory pro potenciální vývoj terapií proti obezitě.

- Po dlouhých vědeckých diskuzích v posledních 20 – 30 letech se podařilo předložit model mechanismu UCP1, který zatím neodporuje žádným experimentálním výsledkům. Navrhovaný model ale ještě není plně uspokojivý, protože nevysvětluje inhibiční roli nukleotidů [54].
- Podle nedávných výzkumů se i lidská hnědá tuková tkáň po expozici chladu umí rekrutovat, čímž přispívá k redukci tělesných tuků [50] a může se uplatnit v potenciálním „nechemickém“ boji proti obezitě.
- Snad nejvýznamnějším objevem posledních deseti let (především pro řešení obezity) je objev béžových tukových buněk a jejich postupná přeměna z bílých adipocytů po působení chladu (přes stimulaci  $\beta_3$ -adrenergních receptorů) [7].

Přes mnohé úspěchy zbývá ještě mnoho neobjasněno. Úsilí vědců je zacíleno především na hledání „léků na obezitu“, případně na nějaké terapeutické manipulace, které by zvýšily disipaci energie. Jednou z taktik je simulace expozice chladu pomocí speciálních látek a aktivace hnědé tukové tkáně (použití kapsinoidů, [50]). Další možností je stimulace browningu – diferenciací bílých adipocytů na béžové tukové buňky. Zaměření studií se specializuje na transkripční faktory a jiné regulační mechanismy, které v organismu podporují recruitment nebo browning. Je pravděpodobné, že za nedlouhou dobu nějaký lék podporující netřesovou termogenezi (též termogenezi indukovanou stravou) bude nalezen.

V boji proti obezitě se ale také objevují studie, které cestu přes netřesovou termogenezi nedoporučují nebo alespoň ukazují její negativní stránky. Podle posledních studií má chladová adaptace doprovázena aktivací sympatického nervového systému negativní nepřímý vliv na vznik krevních sraženin [16], hypertenzi a srdeční a cévní hypertrofii [22]. Vzhledem k výsledkům pokusů zkoumajícím vliv chladové adaptace na srdce a cévní systém [16, 22] by tomuto výzkumu měla být věnována zvýšená pozornost. Hnědá (příp. běžová) tuková tkáň a její schopnost termogeneze při odpovědi na chladový stimulus nebo zvýšený příjem potravy má obrovský potenciál v boji proti obezitě a nemocí s ní spojených. Objevující se negativní stránky netřesové termogeneze a adrenergní stimulace je třeba podrobně zkoumat, aby se případná účinná léčba obezity založená na poznatcích tohoto výzkumu mohla v budoucnosti zavést.

Mimo adaptace na chlad v hnědé tukové tkáni bychom mohli předpokládat ještě celou řadu změn a přizpůsobení v celém organismu a opravdu určité změny potvrzeny a zkoumány jsou (angiogeneze v hnědé tukové tkáni [1], zvýšení inervace, zlepšení izolace [4], větší výkon srdce, zúžení cév v končetinách [3], mobilizace substrátů v celém organismu, aj. [2, 3]). Výsledky těchto studií však zdaleka nejsou vyčerpávající. Zajímavé by mohlo být více zkoumat vstřebávání živin ve střevě a navázat tak na práci potvrzující zvýšený příjem živin sliznicí střeva během expozice chladu [10]. Dále by bylo dobré zkoumat více děje v játrech a jejich reakci na expozici chladu, protože tento orgán má také významnou roli v metabolismu živin [65].

# Seznam literatury

- (1) Xue Y, Petrovic N, Cao R, Larsson O, Lim S, Chen S, Feldmann HM, Liang Z, Zhu Z, Nedergaard J, Cannon B, Cao Y (2009). Hypoxia-independent angiogenesis in adipose tissues during cold acclimation. *Cell Metab* 9(1), 99 – 109.
- (2) Landsberg L, Saville ME, Young JB (1984). Sympathoadrenal system and regulation of thermogenesis. *Am J Physiol* 247 (Endocrinol. Metab. 10), E181 – E189
- (3) Cannon B, Nedergaard J (2004). Brown adipose tissue: Funktion and Physiological Significance. *Physiol Rev* 84, 277 - 359
- (4) Mattsson CL, Csikasz RI, Chernogubova E, Yamamoto DL, Hogberg HT, Amri E, Hutchinson DS, Bengtsson T (2011).  $\beta_1$  Adrenergic receptors increase UCP1 in human MADS brown adipocytes and rescue cold-acclimated  $\beta_3$ -adrenergic receptor-knockout mice via nonshivering thermogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301, E1108 – E1118
- (5) Au-Yong ITHA, Natasha Thorn N, Ganatra R, Perkins AC, Symonds ME (2009). Brown Adipose Tissue and Seasonal Variation in Humans. *Diabetes* 58 (11), 2583 – 2587.
- (6) Shingo Kajimura S, Saito M (2014). A New Era in Brown Adipose Tissue Biology: Molecular Control of Brown Fat Development and Energy Homeostasis. *Annu Rev Physiol* 76, 225 – 249.
- (7) Park A, Kim WK, Bea KH (2014). Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells* 6(1), 33 - 42.
- (8) Ueta CB, Fernandes GW, Capelo LP, Fonseca TL, Fla'via D'Angelo Maculan, Gouveia CHA, Brum PC, Christoffolete MA, Aoki MS, Lancellotti CL, Kim B, Bianco AC, Ribeiro MO (2012).  $\beta_1$  Adrenergic receptor is key to cold- and diet- induced thermogenesis in mice. *J of Endocrinology* 214, 359 – 365.
- (9) van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommerig JW, Smulders NM, Drossaerts JM, Kemerink GJ, Bouvy ND, SchrauwenP, Teule GJ (2009). Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med* 360, 1500 -1508.
- (10) Price ER, Ruff LJ, Guerra A, Karasov WH (2013). Cold exposure increases intestinal paracellular permeability to nutrients in the mouse. *J Exp Biol* 216(Pt 21), 4065 – 70.
- (11) Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, Khandekar M, Virtanen KA, Nuutila P, Schaart G, Huang K, Tu H, van Marken Lichtenbelt WD, Hoeks J, Enerbäck S, Schrauwen P, Spiegelman BM (2012). Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell* 150, 366 – 376.
- (12) Lean ME (1989). Brown adipose tissue in humans. *Proc Nutr Soc* 48, 243 – 256
- (13) Enerbäck S (2010). Human brown adipose tissue. *Cell Metab*, 11, 248 - 252.
- (14) Otto TC, Lane MD (2005). Adipose development from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem* 40, 229 - 242
- (15) Tang QQ, Lane MD (2012). Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem* 81, 715 – 736.
- (16) Dong M, Yang X, Lim S, Cao Z, Honek J, Lu H, Zhang C, Seki T, Hosaka K, Wahlberg E, Yang J, Zhang L, Länne T, Sun B, Li X, Liu Y, Zhang Y, Cao Y (2013). Cold exposure promotes atherosclerotic plaque growth and instability via UCP1-dependent lipolysis. *Cell Metab* 2;18(1), 118 -29.
- (17) Timmons JA, Wennmalm K, Larsson O, Walden TB, Lassmann T, Petrovic N, Hamilton DL, Gimeno RE, Wahlestedt C, Baar K, Nedergaard J, Cannon B (2007). Myogenic gene expression

signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 4401 – 4406.

- (18) Tseng YH, Kokkotou E, Schulz TJ, Huang TL, Winnay JN, Taniguchi CM, Tran TT, Suzuki R, Espinoza DO, Yamamoto Y, Ahrens MJ, Dudley AT, Norris AW, Kulkarni RN, Kahn CR (2008). New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature* 454, 1000 - 1004
- (19) Seale P, Bjork B, Yang W, Kajimura S, Chin S, Kuang S, Scime A, Devarakonda S, Conroe HM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Rudnicki MA, Beier DR, Spiegelman BM (2008). PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. *Nature* 454, 961 – 967.
- (20) Kajimura S, Seale P, Kubota K, Lunsford E, Frangioni JV, Gygi SP, Spiegelman BM (2009). Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16-C/EBP-beta transcriptional complex. *Nature* 460, 1154 – 1158.
- (21) Golozoubova V, Cannon B, Nedergaard J (2006). UCP1 is essential for adaptive adrenergic nonshivering thermogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291, E350 – E357.
- (22) Sun Z (2010). Cardiovascular responses to cold exposure. *Front Biosci (Elite Ed)* 1;2, 495 - 503.
- (23) Adamsons K, Blumberg E, Joelsson I (1969). The effect of ambient temperature upon postnatal changes in oxygen consumption of the Guinea-pig. *Physiol* 202, 261–269.
- (24) Wiesinger G, Heldmaier G, Buchberger A (1989). Effect of photoperiod and acclimation temperature on nonshivering thermogenesis and GDP-binding of brown fat mitochondria in Djungarian hamster *Phodopus sungorus*. *Pflügers Arch* 413, 667–672.
- (25) Brondani LA, Assmann TS, Kullmann Duarte GC, Gross JL, Canani LH, Crispim H (2012). The role of the uncoupling protein 1 (UCP1) on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metab* 56, 4.
- (26) Lowell BB, Susulic VS, Hamann A, Lawitts JA, Himms-Hagen J, Boyer BB, Kozak LP, and Flier JS (1993). Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature* 366, 740–742.
- (27) Melnyk A, Harper ME, and Himms-Hagen J (1997). Raising at thermoneutrality prevents obesity and hyperphagia in BAT-ablated transgenic mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 272, R1088 – R1093.
- (28) Morrison SF, Nakamura K (2011). Central neural pathways for thermoregulation. *Front Biosci*, 16, 74 – 104.
- (29) Hsieh ACL, Carlson LD, Gray G (1957). Role of the sympathetic nervous system in the control of chemical regulation of heat production. *Am J Physiol* 190, 247-251.
- (30) Leduc J (1961). Catecholamine production and release in exposure and acclimation to cold. *Acta Physiol Scand Suppl* 183, 1 – 101.
- (31) Banet M, Hensel H, Liebermann H (1978). The central control of shivering and non-shivering thermogenesis in the rat. *J Physiol London* 383, 569 – 584.
- (32) Hsieh ACL, Carlson LD, Gray G (1957). Role of adrenalin and noradrenalin in the control of chemical regulation of heat production. *Am J Physiol* 190, 243-246.
- (33) Schulz TJ, Tseng YH (2013). Brown adipose tissue: development, metabolism and beyond *Biochem J*. 453(2), 10.
- (34) Bronnikov G, Houstek J, Nedergaard J (1992).  $\beta$  -Adrenergic, cAMP-mediated stimulation of proliferation of brown fat cells in primary culture. Mediation via  $\beta$  1 but not via  $\beta$  3 receptors. *J Biol Chem* 267, 2006 – 2013.

- (35) Rehnmark S, Antonson P, Xanthopoulos KG, Jacobsson A (1993). Differential adrenergic regulation of C/EBP  $\alpha$  and C/EBP  $\beta$  in brown adipose tissue. *FEBS Lett* 318, 235 – 241.
- (36) Rowland LA, Bal NC, Kozak LP, Periasamy M (2015). Uncoupling Protein 1 and Sarcolipin Are Required to Maintain Optimal Thermogenesis and Loss of Both Systems Compromises Survival of Mice Under Cold Stress. *J Biol Chem* ( pii: jbc.M115.637603).
- (37) Lindquist JM, Rehnmark S (1998). Ambient temperature regulation of apoptosis in brown adipose tissue. Erk 1/2 promotes norepinephrine-dependent cell survival. *J Biol Chem* 273, 30147 – 30156.
- (38) Gomez-Ambrosi J, Fruhbeck G, and Martinez JA (2001). Rapid in vivo PGC-1 mRNA upregulation in brown adipose tissue of Wistar rats by a beta (3)-adrenergic agonist and lack of effect of leptin. *Mol Cell Endocrinol* 176, 85 – 90.
- (39) Festuccia WT, Blanchard PG, Deshaies Y (2011). Control of Brown Adipose Tissue Glucose and Lipid Metabolism by PPAR $\gamma$ . *Front Endocrinol (Lausanne)* 2, 84.
- (40) Lindquist JM, Fredriksson JM, Rehnmark S, Cannon B, Nedergaard J (2000).  $\beta$  3- and  $\alpha$ <sub>1</sub>-adrenergic Erk1/2 activation is Src but not Gi-mediated in brown adipocytes. *J Biol Chem* 275, 22670 – 22677.
- (41) Nisoli E, Regianini L, Bulbarelli A, Briscini L, Breacale R, Carruba MO (2001). Protective effects of noradrenaline against tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in cultured rat brown adipocytes: role of nitric oxide-induced heat shock protein 70 expression. *Int J Obes Related Metab Disorders* 25, 1421–1430.
- (42) Bengtsson T, Nedergaard J, and Cannon B (2000). Differential regulation of the gene expression of  $\beta$ -adrenoceptor subtypes in brown adipocytes. *Biochem J* 347, 643–651.
- (43) Chaudhry A, Granneman JG (1997). Effect of hypothyroidism on adenylyl cyclase activity and subtype gene expression in brown adipose tissue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 273, R762 – R767.
- (44) Thonberg H, Nedergaard J, Cannon B (2002). A novel pathway for adrenergic stimulation of cAMP-response-element-binding protein (CREB) phosphorylation: mediation via  $\alpha$ <sub>1</sub>-adrenoceptors and protein kinase C activation. *Biochem J* 364, 73–79.
- (45) Thonberg H, Lindgren EM, Nedergaard J, Cannon B (2001). As the proliferation promoter noradrenaline induces expression of ICER (induced cAMP early repressor) in proliferative brown adipocytes, ICER may not be a universal tumour suppressor. *Biochem J* 354, 169 – 177.
- (46) Garlid KD, Jaburek M, Jezek P, Varecha M (2000). How do uncoupling proteins uncouple? *Biochim Biophys Acta* 1459, 383 – 389.
- (47) Busiello RA, Busiello RA, Savarese S, Lombardi A (2015). Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. *Front. Physiol.* 6 - 36.
- (48) Nabben M, Hoeks J, Moonen-Kornips E, van Beurden D, Briedé J, Matthijs KC, Hesselink MKC, Glatz JFC, Schrauwen P (2011). Significance of uncoupling protein 3 in mitochondrial function upon mid- and long-term dietary high-fat exposure. *FEBS Letters* Volume 585 Issue 24, 4010 – 4017.
- (49) Townsend KL and Yu-Hua Tseng (2014). Brown Fat Fuel Utilization and Thermogenesis. *Trends Endocrinol Metab* 25(4), 168 – 177.
- (50) Yoneshiro T, Aita S, Matsushita M, Kayahara T, Kameya T, Kawai Y, Iwanaga T, Saito M (2013). Recruited brown adipose tissue as an antiobesity agent in humans. *J Clin Invest* 123, 3404 – 3408.
- (51) Yu XX, Lewin DA, Forrest W, Adams SH (2002). Cold elicits the simultaneous induction of fatty acid synthesis and beta-oxidation in murine brown adipose tissue: prediction from differential gene expression and confirmation in vivo. *FASEB J* 16, 155 – 168.



- (52) Roberts JL, Ashwell M, Enser M (1986). Brown adipose tissue triacylglycerol fatty acids of obese and lean mice: in situ and in transplants. *Lipids* 21, 195 – 201.
- (53) Yamamoto T, Yamamoto A, Watanabe M, Kataoka M, Terada H, Shinohara Y (2011). Quantitative evaluation of the effects of cold exposure of rats on the expression levels of ten FABP isoforms in brown adipose tissue. *Biotechnol Lett* 33, 237 – 242.
- (54) Fedorenko A, Lishko PV, Kirichok Y (2012). Mechanism of Fatty-Acid-Dependent UCP1 Uncoupling in Brown Fat Mitochondria. *Cell* 151, 400 – 413.
- (55) Costain WJ, Mainra R, Desautels M, Sulakhe PV (1996). Expressed  $\alpha_1$ -adrenoceptors in adult rat brown adipocytes are primarily of  $\alpha_{1A}$  subtype. *Can J Physiol Pharmacol* 74, 234 – 240.
- (56) Madden CJ, Tupone D, Cano G, Morrison SF (2013). Alpha-2 adrenergic receptor-mediated inhibition of thermogenesis. *J Neurosci* 30; 33(5), 2017–2028.
- (57) Pecqueur C, Alves-Guerra MC, Gelly C, Levi-Meyrueis C, Couplan E, Collins S, Ricquier D, Bouillaud F, Miroux B (2001). Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation. *J Biol Chem* 276, 8705 – 8712.
- (58) Zhao, J, Cannon B, Nedergaard J (1998). Thermogenesis is  $\beta_3$ - but not  $\beta_1$ -adrenergically mediated in rat brown fat cells, even after cold acclimation. *Am. J Physiol* 275 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 44), R2002 – R2011.
- (59) Park JW, Jung KH, Lee JH, Quach CH, Moon SH, Cho YS, Lee KH (2015). 18F-FDG PET/CT monitoring of  $\beta_3$  agonist-stimulated brown adipocyte recruitment in white adipose tissue. *J Nucl Med* 56(1), 153 – 8.
- (60) Wang Z, Li V, Chan GCK, Phan T, Nudelman AS, Xia Z, Storm DR (2009). Adult Type 3 Adenylyl Cyclase – Deficient Mice Are Obese. *PLoS ONE* 4(9), e6979.
- (61) Wilcke M, Nedergaard J (1989).  $\alpha_1$ - and  $\beta$ -adrenergic regulation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels in brown adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 163, 292–300.
- (62) Grimpo K, Völker MN, Heppe EN, Steve Braun S, Heverhagen ST, Heldmaier G (2014). Brown adipose tissue dynamics in wild-type and UCP1-knockout mice: in vivo insights with magnetic resonance. *J Lipid Res*, 55(3), 398–409.
- (63) Meyer CW, Willershäuser M, Jastroch M, Rourke BC, Fromme T, Oelkrug R, Heldmaier G, Klingenspor M (2010). Adaptive thermogenesis and thermal conductance in wild-type and UCP1-KO mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 299(5), R1396-406.
- (64) Brondani LA, Duarte GC, Canani LH, Crispim D (2014). The presence of at least three alleles of the ADRB3 Trp64Arg (C/T) and UCP1 -3826A/G polymorphisms is associated with protection to overweight/obesity and with higher high-density lipoprotein cholesterol levels in Caucasian-Brazilian patients with type 2 diabetes. *Metab Syndr Relat Disord* 12(1), 16 - 24.
- (65) André MK, Archer A, Barros RP, Parini P, Gustafsson JA (2011). Both liver-X receptor (LXR) isoforms control energy expenditure by regulating Brown Adipose Tissue activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108(1), 403 – 408.